

VU Research Portal

Dynamics of Active and Passive Microtubule-Crosslinking Proteins

Kapitein, L.C.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Kapitein, L. C. (2007). *Dynamics of Active and Passive Microtubule-Crosslinking Proteins*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

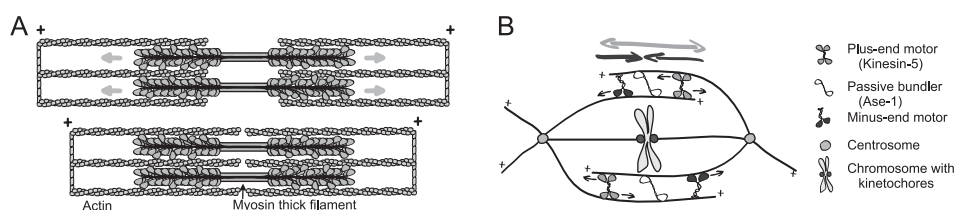
vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Biofysici vinden het interessant om met een natuurkundige bril naar biologische processen te kijken. Niet alleen bedenken ze allerlei slimme trucs om zulke processen te bekijken, ook proberen ze deze processen dieper te begrijpen door middel van nauwkeurige metingen en wiskundige modellen. De samentrekking van spieren, die bijna elke beweging van dieren en mensen mogelijk maakt, is een heel mooi voorbeeld van een biologisch proces waarvoor dit goed gelukt is. Door middel van een heel nauwkeurige vorm van microscopie, elektronen microscopie, is de ruimtelijke structuur van spierweefsel ontrafeld. Dit bleek een heel regelmatig patroon te zijn waarin zogeheten dikke eiwit structuren netjes tussen dunne eiwit buisjes liggen. Deze dikke structuren bestaan uit clusters van motor moleculen, myosine, die door samen te werken in een vaste richting over de dunne buisjes, actine, kunnen bewegen. Doordat de actine buisjes om en om georiënteerd zijn, kan een myosine cluster de actine buizen naar elkaar toe trekken, waardoor de spier samentrekt (Figuur S.1A). De afgelopen 10–20 jaar hebben allerlei nieuwe microscopische technieken heel precieze kracht en positiemetingen aan dit systeem mogelijk gemaakt, zodat zelfs de minuscule krachten en verplaatsingen van afzonderlijke moleculen konden worden gedetecteerd.

Inmiddels is het heel duidelijk dat myosine niet het enige motoreiwit is dat we nodig hebben om te functioneren. Eigenlijk elke belangrijke taak in de cel wordt uitgevoerd door een machinerie van eiwitten. Wij zijn bijvoorbeeld allemaal ooit begonnen als een bevruchte eicel en om te kunnen groeien, moest deze cel zich vermenigvuldigen door zich in twee dochtercellen te delen, een proces dat mitose heet. Voordat een cel zich echter kan delen, moet eerst het volledige genetisch materiaal, het DNA, gekopieerd worden en hiervoor is een hele collectie motoreiwitten beschikbaar die het DNA splitst, leest en aanvult.

Maar ook het eerlijk verdelen van het verdubbelde DNA over de twee dochtercellen is geen gemakkelijke taak. Om dit mogelijk te maken wordt het celskelet, verschillende soorten eiwitbuizen die de cel zijn vorm geven, volledig opnieuw georganiseerd en ook bij dit proces zijn weer tal van motoreiwitten betrokken. Voor aanvang van de reorganisatie zijn de grootste buizen, microtubuli, geordend in een stervorm met een duidelijk centrum of pool. Na de reorganisatie heeft het celskelet twee polen met daar



Figuur S.1: (A) Moleculaire basis van spiersamentrekking. (B) Model voor de vorming van de mitotische spoel.

tussenin het DNA en zijn de buizen georganiseerd in een spoel-vorm, ongeveer zoals de veldlijnen van een magneet met twee polen. Echter, lopen bij de magnetische spoel alle lijnen van de ene naar de andere pool, in de mitotische spoel lopen alle buizen van de pool naar het DNA en liggen de buizen dus ongeveer om en om georiënteerd in het midden van de spoel (Figuur S.1B). Als de spoelvorm eenmaal gereed is, wordt het DNA langs de buizen naar de twee polen getrokken en kan de cel zich verder delen. Hoewel dit proces al heel lang kan worden bekeken onder de microscoop, is het nog lang niet begrepen hoe dit allemaal gebeurt.

De orientatie van de microtubuli in de mitotische spoel doet een beetje denken aan de orientatie van de actine-filamenten in spieren. Daarom werd door sommigen al gauw verondersteld dat er ook myosine-achtige eiwitten moesten zijn die over microtubuli kunnen lopen. In 1985 werd een eiwit ontdekt dat dit inderdaad kon en het kreeg de naam kinesine. Inmiddels blijken er heel veel verschillende kinesine eiwit families te zijn, waarvan sommige belangrijk zijn tijdens celdeling. De beste kandidaat voor de myosine-taak, het langs elkaar schuiven van tegenovergesteld georiënteerde microtubuli, leek de Kinesine-5 familie te zijn, waarvan de variant in gewervelde organismen Eg5 wordt genoemd.

In dit proefschrift heb ik getest in hoeverre Eg5 inderdaad opereert op microtubuli zoals myosine dat doet op actine. Kan Eg5 deze buizen langs elkaar schuiven en zo de reorganisatie van het celskelet veroorzaken? Vormt Eg5 ook 'dikke' clusters of kunnen deze motoren individueel opereren? Hoe wordt Eg5 geactiveerd? Om deze vragen te beantwoorden, moest ik eerst een microscoop bouwen waarin een paar belangrijke technieken kunnen worden gecombineerd, zoals het zichtbaar maken van afzonderlijke eiwitten en het mechanisch manipuleren—vastpakken en verplaatsen—van motor eiwitten of eiwit-buizen. Deze microscoop is beschreven in Hoofdstuk 3, waarin ook wordt aangetoond dat beide technieken inderdaad tegelijk gebruikt kunnen worden.

In Hoofdstuk 4 beantwoord ik de eerste vraag en laat ik zien dat Eg5 microtubuli langs elkaar kan schuiven en ze zo sorteert, door tegelijkertijd naar het plus-uiteinde van beide buizen te lopen. Alleen bij buizen die tegenovergesteld georiënteerd zijn, leidt dit lopen tot het schuiven van de buizen, terwijl buizen met een gelijke orientatie

niet verplaatst worden. Deze resultaten onthullen een fundamenteel mechanisme voor de ruimtelijke organisatie van microtubuli tijdens celdeling.

Eg5 is dus een speciaal motor eiwit dat tegelijkertijd met vier voeten over twee buizen in tegengestelde richting kan lopen (zie voorkant). Om meer over dit proces te leren, wordt in de volgende twee hoofdstukken (Hoofdstuk 5 en 6) de beweging van afzonderlijke motoren zichtbaar gemaakt en bestudeerd. Het laat zien dat afzonderlijke Eg5 moleculen zich onafhankelijk kunnen voortbewegen over de buizen en dus geen clusters hoeven te vormen, in tegenstelling tot myosine. Verder hebben we het effect van een klein molecuul getest waarvan bekend is dat het Eg5 kan remmen. Het blijkt dat toevoeging van dit stofje een speciaal soort beweging versterkt, waarbij Eg5 niet meer continu naar de plus kant loopt, maar over de microtubulus heen en weer zwerft in een soort dronkenmansloop, ook wel diffusie genoemd. Verdere bestudering van de beweging van Eg5 in allerlei condities heeft aangetoond dat deze diffusie niet alleen plaatsvindt met het stofje in de buurt, maar een natuurlijk aanwezige toestand is. Sterker nog, in de omstandigheden die het meest lijken op die in de levende cel, loopt Eg5 niet meer naar het plus eind maar diffundeert het zomaar wat over de microtubuli. Dat lijkt tamelijk doelloos en is dus raar. Ook roept het onmiddellijk de vraag op hoe het op deze manier buizen langs elkaar kan schuiven. De oplossing voor deze paradox wordt beschreven in Hoofdstuk 6 en is bijna te mooi om waar te zijn: Alleen als het eiwit aan twee buizen tegelijk gebonden is gaat het in een specifieke richting lopen. Tot die tijd wacht het af en spaart het dus zijn krachten.

Tot slot bestudeer ik in Hoofdstuk 7 nog een ander eiwit dat microtubuli kan bundelen, Ase1. Het is alleen geen motor eiwit en daarom heet het een passieve bundelaar in plaats van een actieve bundelaar. Het blijkt echter dat dit eiwit wel net als Eg5 over microtubuli kan diffunderen. Verder laat ik zien dat, in tegenstelling tot Eg5, dit eiwit wel weer aggregaten vormt om goed te kunnen bundelen. Dit lijkt een beetje op myosine, maar we tonen tevens aan dat het eigenlijk heel anders gebeurt, namelijk alleen op de buizen.

Door deze experimenten en resultaten weten we iets meer van de processen waarmee het geraamte van de cel wordt opgebouwd en omgevormd. De beschreven methoden kunnen verder worden uitgebreid om ook andere microtubulus bindende eiwitten of combinaties van eiwitten te bestuderen. Een andere uitdaging is om deze processen in de cel beter zichtbaar te maken en te onderzoeken. De komende jaren hoop ik dat te doen in hersencellen, die hun ingewikkelde vormen te danken hebben aan een heel dynamisch celskelet.